

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(54) PRODUCTION OF HIGHLY UNSATURATED ALIPHATIC ACID WITH FILAMENTOUS FUNGUS

(11) 1-199588 (A) (43) 10.8.1989 (19) JP
 (21) Appl. No. 63-134354 (22) 2.6.1988 (33) JP (31) 87p.270624 (32) 27.10.1987
 (71) NITTO CHEM IND CO LTD (72) FUJIO TO(3)
 (51) Int. Cl¹. C12P7/64//(C12P7/64,C12R1:645)

PURPOSE: To effectively obtain the title compound having a function of reducing cholesterol of blood serum, by culturing a filamentous fungus belonging to the genus *Thraustotheca*, etc., and capable of producing a lipid having a high content of highly unsaturated aliphatic acid and gathering a product from the culture.

CONSTITUTION: A filamentous fungus (e.g. *Thraustotheca clavata* ATCC 34,112) belonging to the genus *Thraustotheca*, *Achlya*, *Haliphthorous*, *Rizophydium* or *Japonochytrium* and capable of producing of a lipid highly containing a highly unsaturated aliphatic acid is cultured, then the culture solution is filtered and the cell is recovered and freeze-dried. Thus the dried cell is pulverized, extracted and purified to afford a highly unsaturated aliphatic acid.

(54) PRODUCTION OF L-LYSINE BY FERMENTATION METHOD

(11) 1-199589 (A) (43) 10.8.1989 (19) JP
 (21) Appl. No. 63-23542 (22) 3.2.1988
 (71) KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD (72) TOSHIHIKO HIRAO(3)
 (51) Int. Cl¹. C12P13/08//(C12P13/08,C12R1:13)(C12P13/08,C12R1:15)

PURPOSE: To industrially obtain L-lysine from a culture mixture at a low cost, by culturing a bacterium which is coryneform bacterium, capable of producing glutamic acid, has resistances to iturin and analog substance, and is capable of producing L-lysine.

CONSTITUTION: A bacterium [e.g., *Corynebacterium glutamicum* H-4934 stock (FERM BP-1655)] belonging to a coryneform bacterium capable of producing glutamic acid, having resistances to iturin and analog substance and capable of producing lysine is cultured in a culture medium and L-lysine is created and stored in the culture mixture and L-lysine is gathered from the culture mixture. Preferably the culture is carried out under aerobic conditions at 20~40°C while preserving pH of the culture medium in the vicinity of neutral.

(54) PRODUCTION OF ASCORBIC ACID-2-PHOSPHATE

(11) 1-199590 (A) (43) 10.8.1989 (19) JP
 (21) Appl. No. 63-70218 (22) 24.3.1988 (33) JP (31) 87p.254106 (32) 8.10.1987
 (71) KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD (72) TATSURO FUJIO(2)
 (51) Int. Cl¹. C12P17/04//(C12P17/04,C12R1:22)(C12P17/04,C12R1:05)(C12P17/04,C12R1:13)(C12P17/04,C12R1:38)(C12P17/04,C12R1:20)(C12P17/04,C12R1:64)(C12P17/04,C12R1:425)(C12P17/04,C12R1:07)(C12P17/04,C12R1:15)(C12P17/04,C12R1:01)

PURPOSE: To industrially obtain ascorbic acid-2-phosphate slightly causing any degradation by light, heat or air, etc., at a low cost, by microbiologically reacting (arabo)ascorbic acid with phosphate donor.

CONSTITUTION: An active bacterium which creates an ascorbic acid-2-phosphate from ascorbic acid or araboascorbic acid and a phosphate group donor (preferably paranitrophenyl phosphate, acetylphosphate, pyrophosphoric acid, tripolyphosphoric acid, tetrapolyphosphoric acid, polyphosphoric acid) has been found. The bacterium is *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, etc.

⑫ 公開特許公報(A) 平1-199588

⑤Int. Cl.⁴
C 12 P 7/64
//C 12 P 7/64
C 12 R 1:645)

識別記号 庁内整理番号
7236-4B

④公開 平成1年(1989)8月10日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全4頁)

④発明の名称 糸状菌による高度不飽和脂肪酸の製造法

②特 願 昭63-134354

②出 願 昭63(1988)6月2日

優先権主張 ②昭62(1987)10月27日③日本(JP)③特願 昭62-270624

⑦発明者 湯 不 二 夫 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日東化学工業株式会社内
⑦発明者 本 吉 貞 彦 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日東化学工業株式会社内
⑦発明者 二 階 堂 雄 康 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日東化学工業株式会社内
⑦発明者 柳 田 元 男 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日東化学工業株式会社内
⑦出 願 人 日東化学工業株式会社 東京都千代田区丸の内1丁目5番1号

明 細 書

1. 発明の名称

糸状菌による高度不飽和脂肪酸の製造法

2. 特許請求の範囲

Thraustotheca 属、*Achlya* 属、*Haliphthorouss* 属
Rizophyidium 属または *Japonochytrium* 属に属し、
高度不飽和脂肪酸含量の高い脂質生産能を有する
糸状菌を培養し、培養物より高度不飽和脂肪酸含
量の高い脂質を採取することを特徴とする糸状菌
による高度不飽和脂肪酸の製造法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は糸状菌を栄養培地に培養し、培養物より高度不飽和脂肪酸含量の高い脂質を得ることによる高度不飽和脂肪酸の製造法に関する。

本発明において製造される高度不飽和脂肪酸は炭素数18~22、不飽和二重結合数3以上の脂肪酸であり、具体的には、例えばγ-リノレン酸(9,12,15-オクタデカトリエン酸)、ジホモγ-リノレン酸(8,11,14-エイコサトリエン酸)、アラ

キドン酸(5,8,11,14-エイコサテトラエン酸)、EPA(5,8,11,14,17-エイコサペンタエン酸)、DTA(7,10,13,16-ドコサテトラエン酸)、DPA(4,7,10,13,16-または7,10,13,16,19-ドコサペンタエン酸)およびDHA(4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸)等を総称するものである。

これら高度不飽和脂肪酸は、哺乳動物では体内において合成することのできない必須脂肪酸である。ジホモγ-リノレン酸はプロスタグランジンE₁、F₁など、アラキドン酸はプロスタグランジンE₂、F₂、I₂、トロンボキサンA₂など、EPAはプロスタグランジンE₃、F₃、I₃、トロンボキサンA₃などのそれぞれ前駆体として知られており、重要であると同時に、高度不飽和脂肪酸自身、生体内において多くの生理活性を示すことが知られている。例えば、EPA、DHA等は抗血栓作用、心臓病、血中全コレステロールの低下作用等に対する効果が注目されている。

〔従来の技術およびその問題点〕

これら高度不飽和脂肪酸中、アラキドン酸を含

む微生物としては、これまでに、原生動物のユウグレナのほかに、糸状菌である *Conidiobolus* 属、*Trichothecium* 属、*Entomophthora* 属、*Phytophthora* 属、*Saprolegnia* 属、*Pythium* 属、*Mortierella* 属および *Blastocladiella* 属が知られている。これらの微生物は同時にジホモγーリノレン酸を含んでいる。また、EPAを含む微生物としても糸状菌である *Phytophthora* 属、*Saprolegnia* 属、*Pythium* 属、*Mortierella* 属が報告されている〔H. B. WHITE and S. S. POWELL *Biochim. Biophys. Acta* 116:391(1966)、D. Tyrell *Can. J. Microbiol.* 13:755(1967) 等〕。その他、培養の際に炭化水素を添加することにより、アラキドン酸が得られる菌として、糸状菌の *Aspergillus* 属、*Fusarium* 属、*Penicillium* 属、*Porphyridium* 属、*Mucor* 属および *Rhizopus* 属が知られている〔特公昭56-19231号公報〕。

また、DHAなどの高度不飽和脂肪酸は魚油から抽出されているが、魚油（鯨油、鰹油）中の該脂肪酸の含有量が低いことや、高度不飽和脂肪酸

はそれ自身酸化分解され易い等により、高純度にする目的とする高度不飽和脂肪酸を得ることは困難である。

〔問題点を解決するための手段〕

このような状況下、本発明者らは、高度不飽和脂肪酸を微生物を用い製造することが最も有利と考え、高度不飽和脂肪酸含量の高い脂質を生産する能力を有する糸状菌について鋭意検討した結果 *American Type Culture Collection* (ATCC) に保存され、カタログに記載されている糸状菌である *Thraustotheca clavata* ATCC 34112、*Achlya bisexualis* ATCC 14524、*Haliphthorouss philippinensis* ATCC 58303、*Rizophydium littoreum* ATCC 36100および *Japonochytrium* sp. ATCC 28207 が、高度不飽和脂肪酸を生産することを見出し、本発明はこの知見によりなされたものである。

すなわち、本発明は *Thraustotheca* 属、*Achlya* 属、*Haliphthorouss* 属、*Rizophydium* 属または *Japonochytrium* 属に属し、高度不飽和脂肪酸含量の高い脂質生産能を有する糸状菌を培養し、培養物

- 3 -

より高度不飽和脂肪酸含量の高い脂質を採取することを特徴とする糸状菌による高度不飽和脂肪酸の製造法である。

上記糸状菌を培養する培地組成については特に規定するものではないが、炭素源としては、グルコース、エタノール、グリセロールなどが好ましく、その使用量は通常 0.5~20重量%の範囲である。また、窒素源としてはイースト・エキス、マルツ・エキス、ペプトンなどの有機窒素源の使用が好ましいが、ほかに硝酸塩などの無機窒素も使用でき、その使用量は通常 0.1~10重量%の範囲である。また、これらの成分のほかにアミノ酸、ビタミン類などの微量要素や無機塩類の添加は菌の生育を促進させるのに効果的である。

培地のpHは4~10、好ましくは5~8、培養温度は10~35℃の範囲が良く、培養時間は2~15日間程度必要である。

培養は、通常液体培養培地で、静置培養、振とう培養、通気攪拌培養などの方法により行う。

このようにして得られた培養物より、濾過、遠

- 4 -

心分離などの方法で菌体を集め、その菌体より脂質抽出を行う。脂質の抽出は常法に従い、例えば溶媒抽出などによって行われる。

〔実施例〕

実施例 1.

下記の有機栄養培地 1 ℓ に *Thraustotheca clavata* ATCC 34112 を接種し、25℃で7日間振とう培養後、濾過にて菌体を回収し凍結乾燥した。これにより、5.8 g の乾燥菌体を得た。この乾燥菌体を粉砕して Folch 法により抽出精製した後、溶媒を減圧留去し、重量法により全脂質を測定した。その結果、0.5 g の粗脂質が得られた。

| | | |
|----|----------|----------|
| 培地 | グルコース | 10 g / ℓ |
| | イースト・エキス | 3 g / ℓ |
| | マルツ・エキス | 3 g / ℓ |
| | トリプトン | 5 g / ℓ |
| | 蒸留水 | 1 ℓ |
| | pH 7.0 | |

菌体から抽出精製した脂質は一部をメチルエステル化した後、ガスクロマトグラフィーにより脂

脂肪酸組成の分析を行った。その結果を表-1に示した。

尚、ガスクロマトグラフィーにより得られた各ピークは、マススペクトロメトリーにより同定を行った。

ガスクロマトグラフィー分析条件

カラム充填剤 Diasolid ZF カラム温度 200℃
 キャリヤーガス N₂ 検出器温度 250℃
 検出器 FID 注入温度 250℃
 カラム 1.5m × 3 φ

表-1

| 脂肪酸 | 構成比(%) |
|-------------|--------|
| パルミチン酸 | 20.4 |
| ステアリン酸 | 3.9 |
| オレイン酸 | 14.5 |
| リノール酸 | 11.5 |
| γ-リノレン酸 | 4.6 |
| ジホモ-γ-リノレン酸 | 3.0 |
| アラキドン酸 | 23.8 |
| EPA | 5.1 |

乾燥菌体当りのアラキドン酸含量は 21.6 mg/g である。

乾燥菌体当りの EPA 含量は 4.6 mg/g である。

- 7 -

ilippinensis ATCC 58303 を接種し、以後、実施例 1 と同様の操作を行い、脂肪酸組成を分析し、結果を表-3に示した。

培地 グルコース 5g/ℓ
 イースト・エキス 1g/ℓ
 ポリペプトン 1g/ℓ
 人工海水 1 ℓ
 pH 6.5

表-3

| 脂肪酸 | 構成比(%) |
|---------|--------|
| パルミチン酸 | 28.0 |
| ステアリン酸 | 2.6 |
| オレイン酸 | 2.0 |
| リノール酸 | 10.7 |
| γ-リノレン酸 | 5.2 |
| アラキドン酸 | 16.4 |
| EPA | 28.9 |

実施例 4.

下記の有機栄養培地 1 ℓ に *Rizophydium littoreum* ATCC 36100 を接種し、以後、実施例 1 と同様の操作を行い、脂肪酸組成を分析し、結果を表-4に示した。

実施例 2.

下記の有機栄養培地 1 ℓ に *Achlya bisexualis* ATCC 14524 を接種し、以後、実施例 1 と同様の操作を行い、脂肪酸組成を分析した。

結果を表-2に示した。

培地 グルコース 10g/ℓ
 イースト・エキス 3g/ℓ
 マルツ・エキス 3g/ℓ
 ポリペプトン 5g/ℓ
 蒸留水 1 ℓ
 pH 6.5

表-2

| 脂肪酸 | 構成比(%) |
|---------|--------|
| パルミチン酸 | 24.7 |
| ステアリン酸 | 4.2 |
| オレイン酸 | 17.5 |
| リノール酸 | 9.3 |
| γ-リノレン酸 | 0.3 |
| アラキドン酸 | 21.1 |
| EPA | 6.8 |

実施例 3.

下記の有機栄養培地 1 ℓ に *Haliphthorou ph-*

- 8 -

培地 グルコース 5g/ℓ
 イースト・エキス 1g/ℓ
 ポリペプトン 1g/ℓ
 人工海水 1 ℓ
 pH 6.5

表-4

| 脂肪酸 | 構成比(%) |
|---------|--------|
| パルミチン酸 | 20.1 |
| ステアリン酸 | 0.9 |
| オレイン酸 | 16.7 |
| リノール酸 | 6.4 |
| γ-リノレン酸 | 7.8 |
| アラキドン酸 | 10.5 |
| EPA | 10.5 |

実施例 5.

下記の有機栄養培地 1 ℓ に *Japonochytrium sp.* ATCC 28207 を接種し、以後、実施例 1 と同様の操作を行い、1.7g の乾燥菌体、次いで 0.14g の粗脂質が得られた。さらに、実施例 1 と同様に、この脂質の脂肪酸組成を分析した。

結果を表-5に示した。

培地 グルコース 10g/ℓ
 イースト・エキス 3g/ℓ
 マルツ・エキス 3g/ℓ
 ペプトン 1g/ℓ
 人工海水 1ℓ
 pH 7.0

表 - 5

| 脂 肪 酸 | 構 成 比 (%) |
|---------------|-----------|
| パ ル ミ チ ン 酸 | 22.2 |
| ス テ ア リ ン 酸 | 1.2 |
| オ レ イ ン 酸 | 2.7 |
| リ ノ ー ル 酸 | 2.8 |
| γ - リ ノ レ ン 酸 | 0.6 |
| ア ラ キ ド ン 酸 | 10.5 |
| E P A | 6.4 |
| D T A | 2.9 |
| D P A | 15.2 |
| D H A | 30.0 |

特許出願人

日東化学工業株式会社